

## ВЛИЯНИЕ СТАБИЛИЗИРУЮЩИХ МУТАЦИЙ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЧАСТИ $\alpha$ -ЦЕПИ ТРОПОМИОЗИНА НА ИЗГИБНУЮ ЖЕСТКОСТЬ РЕКОНСТРУИРОВАННЫХ ТОНКИХ НИТЕЙ, СОДЕРЖАЩИХ ЕГО $\alpha\beta$ -ГЕТЕРОДИМЕРЫ

© 2018 г. С.Р. Набиев\*, Л.В. Никитина\*, О.П. Герцен\*, А.М. Матюшенко\*\*, Д.В. Щепкин\*, Г.В. Копылова\*, С.Ю. Бершицкий\*, А.К. Цатурян\*\*\*, Д.И. Левицкий\*\* \*\*\*\*

\*Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, 620049, Екатеринбург, ул. Первомайская, 106

\*\*Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33

\*\*\*Научно-исследовательский институт механики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Мичуринский просп., 1

\*\*\*\*Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, 1/40

E-mail: Levitsky@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 17.11.17 г.

Исследовано влияние замены двух высококонсервативных неканонических остатков в  $\alpha$ -цепи тропомиозина – Asp137 и Gly126 – каноническими остатками Leu и Arg на механические свойства реконструированных тонких нитей, содержащих  $\alpha\beta$ -гетеродимеры тропомиозина. Для этого реконструированные тонкие нити, содержащие фибриллярный актин, тропомиозин и тропонин, растягивали с помощью оптической ловушки. Полученные диаграммы «растяжение – сила» обрабатывали с помощью ранее предложенной математической модели и получали оценку изгибной жесткости нити. Показано, что тонкие нити, содержащие  $\alpha\beta$ -гетеродимеры тропомиозина с  $\alpha$ -цепями псевдодикого типа, т.е. с заменой S190A, имеют примерно такую же изгибную жесткость, как и нити с  $\alpha\alpha$ -гомодимерами тропомиозина. Внесение стабилизирующей замены D137L в  $\alpha$ -цепь тропомиозина не вызывало статистически достоверного изменения изгибной жесткости нитей, содержащих  $\alpha\beta$ -гетеродимеры тропомиозина, в то время как замены G126R и G126R/D137L приводили к некоторому увеличению этой жесткости. Это увеличение жесткости было, однако, намного меньше, чем для нитей с  $\alpha\alpha$ -гомодимерами тропомиозина, несущими такие замены в обоих  $\alpha$ -цепях. Обсуждается взаимосвязь полученных результатов с опубликованными данными о влиянии этих стабилизирующих замен в  $\alpha$ -цепи тропомиозина на структурные и функциональные свойства тонких нитей с  $\alpha\beta$ -гетеродимерами тропомиозина.

*Ключевые слова:* тропомиозин,  $\alpha\beta$ -гетеродимеры, изгибная жесткость, оптическая ловушка.

Тропомиозин (ТМ) – регуляторный белок, входящий в структуру актиновых нитей различных клеток и играющий ключевую роль в регуляции сокращения скелетных и сердечных мышц ионами  $\text{Ca}^{2+}$ . Молекула ТМ представляет собой суперспираль (coiled coil), образованную двумя  $\alpha$ -спиральными полипептидными цепями. Изогнутая димерная молекула ТМ обладает высоким сродством к актиновым нитям (F-ак-

тин) и располагается на их спиральной поверхности [1]. Соседние димеры ТМ связываются между собой с ориентацией «голова к хвосту» [1] и образуют непрерывный тяж, который тянется вдоль всей актиновой нити. В быстрых скелетных мышцах экспрессируются две изоформы ТМ –  $\alpha$  и  $\beta$  (по новой номенклатуре – Trm1.1 и Trm2.2 [2]), являющиеся продуктами разных генов (TRM1 и TRM2 соответственно). Вследствие этого димерные молекулы ТМ обычно представлены  $\alpha\alpha$ -гомодимерами и  $\alpha\beta$ -гетеродимерами ( $\beta\beta$ -гомодимеры нестабильны и по-

Сокращения: ТМ – тропомиозин, F-актин – фибриллярный актин.

тому встречаются очень редко) [1,3]. Получение и исследование рекомбинантных  $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ стало возможным лишь относительно недавно благодаря новому методу, предложенному в работе [4].

В центральной части молекулы ТМ имеются два высококонсервативных неканонических остатка – Asp137 [5] и Gly126 [6], дестабилизирующие эту область молекулы. Замена этих неканонических остатков в обеих цепях  $\alpha\alpha$ -гомомеров ТМ на канонические остатки лейцина (мутация D137L) и аргинина (мутация G126R) соответственно стабилизирует молекулу ТМ [5,6]. Одновременная замена одного, а особенно обоих этих остатков в обеих  $\alpha$ -цепях  $\alpha\alpha$ -гомомеров ТМ (мутация D137L/G126R) значительно стабилизирует не только центральную часть ТМ, но и всю его молекулу, включая N-концевой и C-концевой домены [7], повышает жесткость реконструированных тонких нитей, содержащих стабилизированный ТМ и тропонин [8], и увеличивает максимальную скорость их скольжения в искусственной подвижной системе (*in vitro motility assay*) [9].

Влияние этих стабилизирующих замен в  $\alpha$ -цепи  $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ на термостабильность изолированного ТМ и его комплексов с фибриллярным актином оказалось намного менее выраженным, чем для  $\alpha\alpha$ -гомомеров с этими же заменами в обеих цепях [10]. Неожиданные результаты были получены в экспериментах, проведенных в искусственной подвижной системе: стабилизирующая мутация D137L и двойная мутация G126R/D137L в  $\alpha$ -цепи ТМ приводили не к увеличению, а к снижению скорости скольжения тонких нитей, включающих  $\alpha\beta$ -гетеродимеры ТМ с  $\alpha$ -цепями, несущими такие мутации, по сравнению с нестабилизированными гетеродимерами ТМ [10]. Поскольку эффективность регуляции актин-миозинового взаимодействия зависит от жесткости тропомиозинового тяжа [11], то для того, чтобы понять возможную причину этого парадоксального явления, мы измерили изгибную жесткость тонких нитей, содержащих  $\alpha\beta$ -гетеродимеры ТМ со стабилизирующими мутациями в  $\alpha$ -цепи, и сравнили ее с жесткостью нитей, включающих ТМ псевдодикого типа, с помощью оптической ловушки и разработанной нами методики [8].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Получение белков.** Методы получения белков были описаны ранее [7–10]. Вкратце, рекомбинантный скелетно-мышечный  $\alpha$ -ТМ (Trp1.1) с мутациями G126R, D137L и

D137L/G126R получали, используя в качестве белка дикого типа ТМ с мутацией C190A, который можно рассматривать как стабильный аналог белка дикого типа в полностью восстановленном, нативном состоянии, не способный при этом к образованию дисульфидной сшивки между  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепями в  $\alpha\beta$ -гетеродимерах ТМ.

Молекулярно-генетическая конструкция His- $\beta$ -цепи ТМ (т.е.  $\beta$ -цепи ТМ, содержащей N-концевой His-tag) была любезно предоставлена нам проф. М. Дживсом (Prof. M.A. Geeves, Department of Biosciences, University of Kent at Canterbury, Canterbury, Kent, UK). Рекомбинантные  $\beta\beta$ -гомомеры ТМ экспрессировали в штамме *E. coli* BL21(DE3)pLysS, после чего клетки обрабатывали ультразвуком, центрифугировали 20 мин при 15000 *g* и супернатант, содержащий His- $\beta$ -ТМ, очищали методом металло-аффинной хроматографии на колонке His-Trap НР.  $\alpha\beta$ -Гетеродимеры ТМ получали согласно описанной ранее методике [4] с некоторыми введенными нами модификациями [10], что позволило получить чистые препараты  $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ.

Актин получали из скелетных мышц кролика по стандартной методике [12]. Мономерный G-актин полимеризовали в филаменты F-актина, добавляя к нему 100 мМ KCl, 2 мМ АТФ и 4 мМ MgCl<sub>2</sub>. Реконструированные тонкие нити, т.е. актиновые филаменты, содержащие ТМ и тропонин, получали по описанной ранее методике [8].

**Измерение изгибной жесткости реконструированных тонких нитей с помощью оптической ловушки.** Эта методика была подробно описана и обоснована нами ранее [8]. Вкратце, измерительная система была образована двумя шариками диаметром 1,09 мкм, которые удерживали двумя независимыми оптическими ловушками. Ловушки были сформированы сфокусированными лучами света, полученными расщеплением основного луча инфракрасного лазера мощностью до 5 Вт с длиной волны 1064 мкм на две по разному поляризованные компоненты. Концы реконструированной тонкой нити, которую получали из F-актина,  $\alpha\alpha$ -гомомеров или  $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ с  $\alpha$ -цепью, несущей различные мутации, и тропонина, присоединяли к шарикам, покрытым миозином, обработанным N-этилмалеимидом, который играл роль клея. Один из лучей был неподвижен. Смещения шарика, удерживаемого этим лучом, измеряли, проецируя изображение шарика на четырехквadrантный фотодиод, и использовали для измерения растягивающей силы. Второй луч и соответственно удерживаемый им шарик сме-

Значения изгибной жесткости реконструированных тонких нитей, содержащих  $\alpha\alpha$ -гомомеры и  $\alpha\beta$ -гетеродимеры ТМ с различными мутациями в  $\alpha$ -цепи

Мутации в $\alpha$ -цепи ТМ	Изгибная жесткость, $K \times 10^{-26} \text{ Н}\cdot\text{м}^2$ , $M \pm m$ (полный разброс, $n$ )	
	$\alpha\beta$ -гетеродимеры ТМ с заменами в $\alpha$ -цепи	$\alpha\alpha$ -гомомеры ТМ с заменами в обоих $\alpha$ -цепях [8]
C190A	$4,7 \pm 0,6$ (2,2–10,6, $n = 17$ )	$5,4 \pm 0,6$ (3,5–7,5, $n = 7$ )
G126R/C190A	$6,5^* \pm 0,4$ (3,7–9,4, $n = 20$ )	$6,9 \pm 0,6$ (5,6–8,4, $n = 5$ )
D137L/C190A	$4,5^{**} \pm 0,9$ (1,3–13,6, $n = 18$ )	$8,0^* \pm 0,8$ (6,0–12,1, $n = 7$ )
G126R/D137L/C190A	$6,6^{**} \pm 0,6$ (2,3–14,3, $n = 25$ )	$9,3^* \pm 1,0$ (5,2–11,9, $n = 6$ )

Примечания. \* – Достоверное отличие от препарата, содержащего  $\alpha$ -цепь ТМ C190A; \*\* – достоверное отличие от нитей с  $\alpha\alpha$ -гомомером ТМ, содержащим те же мутации в обоих  $\alpha$ -цепях. Достоверность оценивали по  $t$ -тесту Стьюдента на уровне  $p < 0,05$ .

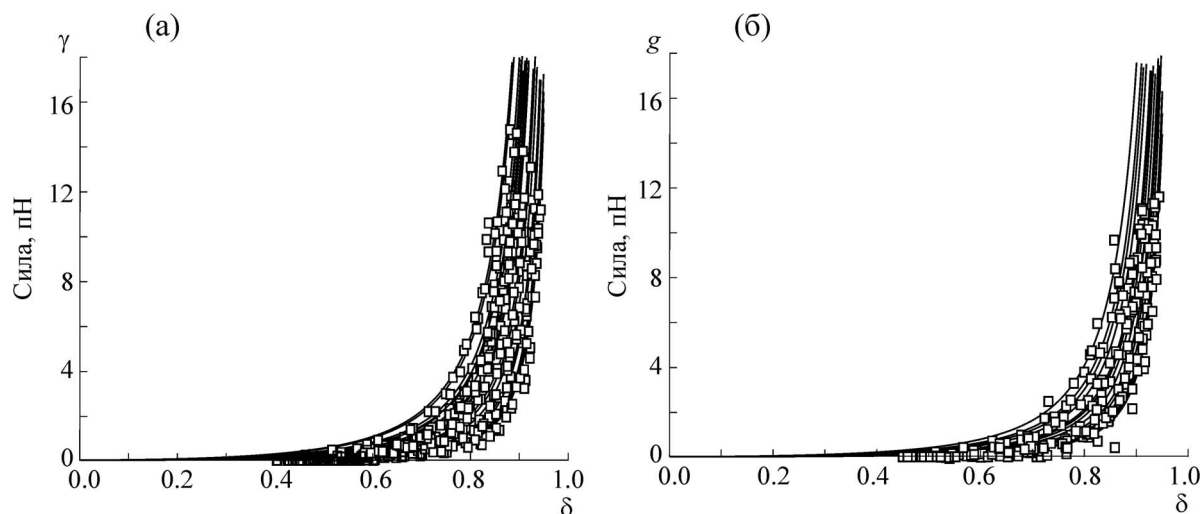
шали шагами по 50 нм, растягивая нить между шариками и измеряя растягивающую силу после каждого шага растяжения. Расстояние между шариками после каждого шага смещения подвижного луча определяли путем обработки микрофотографий с помощью специально разработанной программы анализа изображений. Для определения изгибной жесткости нити по кривой «расстояние между шариками – растягивающая сила» использовали математическую модель, описанную в работе [8]. Опыты проводили при насыщающей концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  (~30 мкМ) при 30°C в присутствии 25 мМ KCl, 25 мМ имидазола, 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 мМ ЭГТА и 20 мМ дитиотреитола.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты измерения изгибной жесткости реконструированных тонких нитей, содержащих  $\alpha\beta$ -гетеродимеры ТМ с различными мутациями в  $\alpha$ -цепи ТМ, а также ранее опубликованные нами данные о жесткости соответствующих  $\alpha\alpha$ -гомомеров с такими мутациями в обоих  $\alpha$ -цепях, приведены в таблице. Видно, что значения изгибной жесткости нитей, включающих  $\alpha\alpha$ -гомомеры и  $\alpha\beta$ -гетеродимеры, содержащие  $\alpha$ -цепи ТМ псевдодикого типа, т.е. несущие мутацию C190A, достоверно не различались между собой и составляли  $(5,4 \pm 0,6) \cdot 10^{-26}$  и  $(4,7 \pm 0,6) \cdot 10^{-26} \text{ Н}\cdot\text{м}^2$  ( $M \pm m$ ) соответственно. Этот результат хорошо согласуется с опубликованными нами данными о том, что структурные и функциональные характеристики этих димеров ТМ близки между собой: как тепловая денатурация ТМ, оцененная по температурной зависимости остаточной эллиптичности при длине волны 222 нм методом кругового дихроизма, так и вызванная нагреванием диссоциация комплексов ТМ с F-актином были весь-

ма схожи для гомо- и гетеродимеров ТМ [10]. Отметим также, что скорость скольжения реконструированных тонких нитей, содержащих  $\alpha\beta$ -гетеродимеры с  $\alpha$ -цепями ТМ псевдодикого типа, вдоль поверхности, покрытой миозином, при насыщающей концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  была почти такой же, как и для  $\alpha\alpha$ -гомомеров ТМ [10]. Таким образом, не только структурные, но и функциональные характеристики  $\alpha\beta$ -гетеродимеров и  $\alpha\alpha$ -гомомеров ТМ псевдодикого типа весьма схожи между собой.

Внесение в  $\alpha$ -цепь ТМ мутации D137L не приводило к достоверному увеличению изгибной жесткости тонких нитей с  $\alpha\beta$ -гетеродимерами ТМ; в то же время небольшое статистически значимое увеличение изгибной жесткости нитей, содержащих  $\alpha\beta$ -гетеродимеры ТМ, по сравнению с ТМ псевдодикого типа наблюдали в случае мутации G126R или двойной мутации G126R/D137L ( $(4,7 \pm 0,6) \cdot 10^{-26} \text{ Н}\cdot\text{м}^2$  до  $(6,5 \pm 0,6) \cdot 10^{-26} \text{ Н}\cdot\text{м}^2$  и  $(6,6 \pm 0,6) \cdot 10^{-26} \text{ Н}\cdot\text{м}^2$  соответственно, см. таблицу). На рисунке показаны диаграммы «растяжение–сила» тонких нитей, содержащих  $\alpha\beta$ -гетеродимеры ТМ с  $\alpha$ -цепями псевдодикого типа, т.е. с мутацией C190A, и с двумя стабилизирующими мутациями (G126R/D137L/C190A). Видно, что индивидуальные кривые «растяжение–сила» хорошо аппроксимируются теоретической формулой [8], а увеличение крутизны этих кривых при внесении обеих стабилизирующих мутаций в  $\alpha$ -цепи  $\alpha\beta$ -гетеродимеров заметно даже на фоне значительного разброса данных в каждой серии экспериментов. Поскольку такое увеличение изгибной жесткости нитей, содержащих  $\alpha\beta$ -гетеродимеры ТМ, наблюдали лишь для ТМ с мутациями G126R или G126R/D137L в  $\alpha$ -цепи, можно предположить, что за это увеличение жесткости отвечает мутация G126R. Неканони-



Диаграммы «растяжение–сила» для реконструированных тонких нитей, содержащих F-актин, тропонин и различные  $\alpha\beta$ -гетеродимеры ТМ со стабилизирующими аминокислотными заменами G126R и D137L в  $\alpha$ -цепи (а) или ТМ псевдодикого типа (б). Приведены все эксперименты, проведенные с каждым из указанных препаратов ТМ. Экспериментальные данные показаны квадратами, непрерывные кривые – аппроксимация данных с помощью математической модели, описанной в работе [8]. Обозначения:  $\gamma$  – сила, растягивающая нить,  $\delta$  – безразмерное удлинение ( $\delta = h/R$ , где  $h$  и  $R$  – соответственно расстояние между шариками и максимальное значение этого расстояния для полностью растянутой тонкой нити).

ческий остаток глицина в положении 126  $\alpha$ -цепи ТМ находится внутри кластера положительно заряженных остатков Arg125 и Lys128, которые вступают в электростатическое взаимодействие с отрицательно заряженным остатком Asp25 актина [13]. Представляется вполне очевидным, что мутация G126R, т.е. замена Gly126 на положительно заряженный остаток аргинина, увеличивает размер и заряд этого кластера, делая взаимодействие  $\alpha$ -цепи ТМ с поверхностью актинового филамента более прочным. Этим, по-видимому, можно объяснить некоторое увеличение изгибной жесткости тонких нитей, содержащих  $\alpha\beta$ -гетеродимеры ТМ с мутациями G126R или G126R/D137L в  $\alpha$ -цепи.

Сопоставляя результаты проведенных исследований с ранее опубликованными нами данными [8], легко заметить значительную разницу в изгибной жесткости между реконструированными тонкими нитями, содержащими  $\alpha\beta$ -гетеродимеры ТМ с мутациями D137L или G126R/D137L (но не G126R) в  $\alpha$ -цепи, и нитями, содержащими  $\alpha\alpha$ -гомодимеры ТМ с такими мутациями в обеих  $\alpha$ -цепях (см. таблицу). В случае  $\alpha\alpha$ -гомодимеров эти мутации существенно увеличивали жесткость нитей по сравнению с ТМ псевдодикого типа (от  $(5,4 \pm 0,6) \cdot 10^{-26}$  Н·м<sup>2</sup> до  $(8,0 \pm 0,8) \cdot 10^{-26}$  Н·м<sup>2</sup> для мутации D137L и до  $(9,3 \pm 1,0) \cdot 10^{-26}$  Н·м<sup>2</sup> для мутации G126R/D137L), в то время как в случае  $\alpha\beta$ -гетеродимеров му-

тация D137L в  $\alpha$ -цепи вообще не оказывала влияния на изгибную жесткость нитей, а двойная мутация G126R/D137L лишь незначительно увеличивала ее (вероятно, за счет описанного выше возможного влияния мутации G126R на прочность взаимодействия ТМ с актиновым филаментом). Такую разницу в изгибной жесткости между тонкими нитями, содержащими  $\alpha\alpha$ -гомодимеры и  $\alpha\beta$ -гетеродимеры ТМ с этими мутациями в  $\alpha$ -цепях, можно объяснить следующим образом. В случае  $\alpha\alpha$ -гомодимеров эти мутации в обеих  $\alpha$ -цепях двойной спирали усиливают как гидрофобные (мутация D137L), так и ионные (мутация G126R) взаимодействия между этими цепями, что отражается в резком повышении стабильности (термостабильности) молекулы ТМ [7,9] и приводит к увеличению жесткости тропомиозинового тяжа на поверхности актинового филамента и в результате к заметному увеличению жесткости всей тонкой нити [8]. Это, однако, совсем не так в случае  $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ, в которых  $\beta$ -цепи содержат высококонсервативные неканонические остатки Asp137 и Gly126, нарушающие структуру двойной спирали молекулы ТМ. Ясно, что замены этих остатков на канонические остатки аргинина и лейцина лишь в одной цепи двойной суперспирали не могут обеспечить полноценного контакта между  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепями  $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ. Действительно, влияние обеих этих замен в  $\alpha$ -цепи (мутация

G126R/D137L) на термостабильность  $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ было выражено гораздо слабее, чем в случае  $\alpha\alpha$ -гомодимеров ТМ с такими заменами в обеих  $\alpha$ -цепях [10]. Видимо, по той же причине мы не смогли выявить статистически достоверного увеличения изгибной жесткости реконструированных тонких нитей при внесении мутации D137L в  $\alpha$ -цепи  $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ и нашли лишь небольшое увеличение жесткости при внесении мутации G126R или обеих стабилизирующих мутаций G126R/D137L.

Самым неожиданным и парадоксальным результатом экспериментов с внесением стабилизирующих мутаций D137L и G126R/D137L в  $\alpha$ -цепь ТМ было снижение на 25–30% скорости скольжения *in vitro* реконструированных тонких нитей, содержащих актин,  $\alpha\beta$ -гетеродимеры ТМ и тропонин, по поверхности, покрытой миозином, в присутствии MgATФ и насыщающей концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  [10]. Заметим, что обе эти мутации вызывали существенное увеличение скорости скольжения нитей, содержащих  $\alpha\alpha$ -гомодимеры ТМ с такими заменами [9,14]. Следует признать, что результаты проведенных в данной работе исследований изгибной жесткости тонких нитей, содержащих  $\alpha\beta$ -гетеродимеры ТМ, не позволяют полностью объяснить эти удивительные функциональные эффекты стабилизирующих мутаций в  $\alpha$ -цепи  $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ; скорее всего, они обусловлены какими-то иными причинами или их совокупностью.

Увеличение скорости скольжения нитей с  $\alpha\alpha$ -гомодимерами ТМ, содержащими в обеих цепях стабилизирующие мутации G126R или D137L, а особенно их комбинацию G126R/D137L, связано, по-видимому, с кооперативными эффектами: максимальная скорость скольжения достигалась при существенно меньшей концентрации миозина на поверхности, чем для ТМ псевдодикого типа [15]. Так, даже небольшого количества миозиновых мостиков, присоединенных к реконструированной тонкой нити, содержащей замены G126R/D137L в ТМ, оказалось достаточно для включения всей регуляторной системы и повышения сродства регулируемого F-актина к миозину. Это, в свою очередь, увеличивало вероятность присоединения головок миозина к соседним мономерам актина и приводило к увеличению скорости скольжения нитей и силы, развиваемой ансамблем миозиновых мостиков, присоединенных к тонкой нити, в расчете на единицу ее длины [15]. Заметим, что увеличение скорости скольжения нитей является фактически результатом увеличения числа взаимодействующих с актином молекул миозина в условиях *in vitro* подвижной системы с неизбежным

сопротивлением их скольжению. В пользу такой интерпретации свидетельствуют данные о том, что величина элементарного перемещения и элементарной силы взаимодействия одиночной молекулы миозина с реконструированной тонкой нитью, содержащей  $\alpha\alpha$ -гомодимеры ТМ псевдодикого типа или включающие стабилизирующие замены G126R и/или D137L, были одинаковыми [15]. Таким образом, влияние стабилизирующих замен в ТМ на скорость скольжения реконструированных нитей осуществляется главным образом путем их влияния на количество миозиновых головок, взаимодействующих с F-актином, составляющим основу тонкой нити, а также, возможно, и на длительность этого взаимодействия [15].

В свете этой интерпретации снижение скорости скольжения тонких нитей, содержащих  $\alpha\beta$ -гетеродимеры ТМ со стабилизирующими заменами G126R и/или D137L в  $\alpha$ -цепи, может объясняться нарушением миозинсвязывающего или актинсвязывающего интерфейса ТМ [16] на поверхности тонкой нити из-за отсутствия партнеров этим заменам в  $\beta$ -цепи такого гетеродимера, что может влиять на снижение сродства миозина к актину тонкой нити либо на время его пребывания в присоединенном состоянии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 16-14-10199).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. И. А. Невзоров и Д. И. Левицкий, Успехи биол. химии **51**, 283 (2011).
2. M. A. Geeves, S. E. Hitchcock-DeGregori, and P. W. Gunning, J. Muscle Res. Cell Motil. **36**, 147 (2015).
3. S. V. Perry, J. Muscle Res. Cell Motil. **22**, 5 (2001).
4. A. Kalyva, A. Schmidtman, and M. A. Geeves, Biochemistry **51**, 6388 (2012).
5. J. P. Sumida, E. Wu, and S. S. Lehrer, J. Biol. Chem. **283**, 6728 (2008).
6. I. A. Nevzorov, O. P. Nikolaeva, Y. A. Kainov, et al., J. Biol. Chem. **286**, 15766 (2011).
7. A. M. Matyushenko, N. V. Artemova, N. N. Sluchanko, and D. I. Levitsky, Biophys. Chem. **196**, 77 (2015).
8. S. R. Nabiev, D. A. Ovsyannikov, G. V. Kopylova, et al., Biophys. J. **109**, 373 (2015).
9. A. M. Matyushenko, N. V. Artemova, D. V. Shchepkin, et al., FEBS J. **281**, 2004 (2014).
10. А. М. Матюшенко, Н. В. Артемова, Д. В. Щепкин и др., Биофизика **61**, 844 (2016)
11. N. A. Metalnikova and A. K. Tsaturyan, Biophys. J. **105**, 941 (2013).
12. J. A. Spudich and S. Watt, J. Biol. Chem. **246**, 4866 (1971).

13. X. E. Li, L. S. Tobacman, J. Y. Mun, et al., *Biophys. J.* **100**, 1005 (2011).
14. Д. В. Щепкин, А. М. Матюшенко, Г. В. Копылова и др., *Acta Naturae* **5**, 130 (2013).
15. D. V. Shchepkin, S. R. Nabiev, G. V. Kopylova, et al., *J. Muscle Res. Cell. Motil.* **38**, 183 (2017).
16. E. Behrmann, M. Müller, P. A. Penczek, et al., *Cell* **150**, 327 (2012).

## **Effects of Stabilizing Mutations in the Central Part of $\alpha$ -Chain of Tropomyosin on Bending Stiffness of Reconstructed Thin Filaments Containing Its $\alpha\beta$ -Heterodimers**

**S.R. Nabiev\*, L.V. Nikitina\*, O.P. Hertsen\*, A.M. Matyushenko\*\*, D.V. Shchepkin\*, G.V. Kopylova\*, S.Y. Bershitsky\*, A.K. Tsaturyan\*\*\*, and D.I. Levitsky\*\* \*\*\*\***

*\*Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Pervomayskaya ul. 106, Yekaterinburg, 620049 Russia*

*\*\*Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Leninsky prosp. 33, Moscow, 119071 Russia*

*\*\*\*Institute of Mechanics, Lomonosov Moscow State University, Mitchurinsky prosp. 1, Moscow, 119991 Russia*

*\*\*\*\*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/40, Moscow, 119992 Russia*

We studied the effect of the replacement of two highly conserved noncanonical residues in the  $\alpha$ -chain of tropomyosin, Asp137 and Gly126, with the canonical ones, Leu and Arg, on the mechanical properties of reconstructed thin filaments containing  $\alpha\beta$ -heterodimers of tropomyosin. For this, the reconstituted thin filaments containing filamentous actin, tropomyosin and troponin were stretched with an optical trap. The resulting extension-force diagrams were analysed using a mathematical model proposed previously in order to estimate the bending stiffness. It has been shown that the filaments containing  $\alpha\beta$ -heterodimers of tropomyosin with  $\alpha$ -chains of pseudo-wild type, i.e. containing substitute C190A, have approximately the same bending stiffness as the filaments with  $\alpha\alpha$ -homodimers of tropomyosin. The stabilizing substitution D137L in the  $\alpha$ -chain of tropomyosin did not cause a statistically significant change in bending stiffness of the filaments containing  $\alpha\beta$ -heterodimers of tropomyosin, while the replacements G126R and G126R/D137L led to a moderate increase in this stiffness. This increase in stiffness, however, was much less pronounced than that for the filaments containing  $\alpha\alpha$ -homodimers of tropomyosin with these substitutions in both  $\alpha$ -chains. The relationship between the results obtained here and those published previously concerning the effect of these stabilizing substitutions in the  $\alpha$ -chain of tropomyosin on the functional properties of thin filaments with  $\alpha\beta$ -heterodimers of tropomyosin is discussed.

*Keywords: tropomyosin,  $\alpha\beta$ -heterodimers, bending stiffness, optical trap*